Lasiodiplodia theobromae 引起之馬拉巴栗編辮苗黑腐病

蘇俊峯[1] 安寶貞[1,6] 楊正偉[1] 徐子惠[1] 陳麗鈴[2] 蔡幸君[3] 黃肇家[4] 謝廷芳[5]

1. 行政院農業委員會農業試驗所植物病理組。台中霧峰。
2. 國立屏東科技大學植物醫學系。屏東內埔。
3. 行政院農業委員會動植物防疫檢疫局台中分局嘉義檢疫站。嘉義市。
4. 行政院農業委員會農業試驗所作物組。台中霧峰。
5. 行政院農業委員會農業試驗所花卉研究中心。雲林古坑。
6. 聯絡作者，電子郵件信箱：pjann5039@gmail.com；傳真：04-23302803。

接受日期：中華民國 103 年 9 月 29 日

摘 要

蘇俊峯、安寶貞、楊正偉、徐子惠、陳麗鈴、蔡幸君、黃肇家、謝廷芳。2014。*Lasiodiplodia theobromae* 引起之馬拉巴栗編辮苗黑腐病。植病會刊 23: 263-269。

2011-2013 年間，在馬拉巴栗的編辮場、集貨場及田間病害調查時發現編辮苗經常發生根部軟化、黑褐色腐敗與纖維化，莖部黃化、枯死，最後導致苗木失編或死亡情形。小編辮苗在編辮後 7-14 天內即會發病，發病率嚴重時可達100%。而移植於田間的中、大編辮苗在移植後 0-3 個月內發病，發病率可高達 60%以上。編辮苗收穫後，送至集貨場的植株亦會由傷口開始發病，造成貨品根部與莖部產生黑色腐敗，使貨品喪失外銷價值。經病原菌分離與病原菌形態鑑定，輔以 ITS 序列比對，且依柯霍氏法則（Koch's postulates）完成病原性測定，病原菌鑑定為 *Lasiodiplodia theobromae*（Pat.）Griff. & Maubl.，造成之病害稱為馬拉巴栗編辮苗黑腐病，英名為 black rot of braided seedlings of Malabar chestnut。病原菌在馬鈴薯葡萄糖瓊脂（PDA）培養基上，菌落形態呈現濃密的灰黑或暗黑色，並會有黑色柄子殼（pycnidia）形成，其大小介於 0.7-3.4 mm 之間，平均 1.9 mm。成熟的柄子殼上有孔口（ostioles），大量成熟的褐色分生孢子（conidia）便由孔口擠壓釋放而出。未成熟的分生孢子透明、無隔膜、近卵形到長橢圓形、基部鈍狀。成熟的分生孢子為橄欖型或短桿狀、雙室、黑褐色、有縱向條紋，大小介於 11.4-17.5 × 21.5-31.1 μm 之間，平均 14.5 × 25.8 μm。本病原菌菌絲在 8-39℃下皆可生長，最適生長溫度為 28℃，生長速率介於 19.5-29 mm/day。供試植株之最適發病溫度為 24-32℃。*L. theobromae* 危害馬拉巴栗為世界首次報導。

關鍵詞：馬拉巴栗、*Lasiodiplodia theobromae*、傷口、編辮苗黑腐病。

緒 言

馬拉巴栗（Malabar chestnut, *Pachira aquatic* Aubl.）原產於中、南美洲，屬於木棉科馬拉巴栗屬，為常綠或半落葉性喬木，是台灣栽培最多的觀葉植物，總面積約 480 公頃，主要分布於彰化與屏東兩地，以彰化溪州栽培最多(8,11)。馬拉巴栗產業以外銷為導向，市場包括日本、韓國、歐洲、美洲等地，但以中國大陸為最大宗，外銷總產值每年約 2 億台幣。

在台灣，馬拉巴栗一年開花兩次，主要花期在 4-6 月，播種期為 7-9 月；次要花期在 10-12 月，播種期為 1-3 月。生產馬拉巴栗苗木分 5 個環節，包括播種、育苗、編辮、定植及採後處理。健康幼苗生長快速，生長三個月後即可依需求進行編辮作業。編辮前 2-3 星期，先將苗木的葉片摘除，編辮當日或前一日再將苗木由田間拔起，送往編辮場進行編辮手續。編辮時，將 5 株苗木編成一束，再將根部切齊後回植田間。編辮苗（簡稱編苗）則依植株高度分為三種，包括 (1) 小編苗：即種子播種 3-6 個月後，於編辮場編製高 18-45 cm 的編苗，可直接出售或假植於椰纖 1-2 個月再出售；(2) 中編苗：即播種後 6-12 個月後編製高 90-110 cm 的編苗，編辮後回植本田，栽培管理 12-18 個月後收穫出售；(3) 大編苗：即播種後 12-18 個月後編製高 130 cm 以上的編苗，編辮後回植本田，栽培管理 18-24 個月後收穫出售。

馬拉巴栗生長勢旺，栽培管理容易，以往外銷順暢，並無重大瓶頸問題發生(11)。但自 2009 年起，部分外銷貨品在出貨櫃前出現嚴重根腐情形，即使篩選無病徵編苗植株，經裝箱、海運、到岸後仍然出現高腐敗率，尤其是白露前後（國曆 9 月上旬）的貨品，其根部腐敗率高達 60-80%以上。馬拉巴栗編苗在生產過程中，由於拔苗與切根手續都會造成嚴重傷口，對植株傷害很大，好幾種病原菌都會趁虛而入，初步發現 *Lasiodiplodia* sp.與 *Pythium* sp.為主要誘發編辮苗根腐病的兇手(2,3)，可造成全株枯死，尤其是愈年幼的小編苗發病率愈高，嚴重時

發病率可高達 50-100%。由於國內有關馬拉巴栗病害的相關研究甚少[5]，本研究擬先針對 *Lasiodiplodia* sp.引起馬拉巴栗苗木失編的病因進行探討，期能提供將來防治該病害的依據。

材料與方法

田間病徵觀察與病害調查

本研究於 2011-2013 年期間不定期前往彰化縣與雲林縣馬拉巴栗的主要栽培區、編辮場及集貨場進行田間病害調查與罹病標本的採集。田間病害調查時，首先觀察田間編苗植株發病的情形，編苗只要其中有一支苗木發病，造成地基部縊縮或失編，即視為發病，並計算發病率（disease incidence, %），發病率（%）=（發病編苗數/調查總編苗數）×100%。田間病害調查時，並將罹病標本採回於實驗室進行病原菌分離。

病原菌分離與鑑定

2011 年 2 月至 2013 年 11 月在不同時期由田間、集貨場或編辮場採回罹病株，首先以消毒過之解剖刀分別切取 1.0 cm^2 的罹病莖與根組織片段，該些組織片段經 0.5%次氯酸鈉(sodium hypochloride)表面消毒 30 sec 後，再用清潔之衛生紙吸乾組織片段表面的水份，最後將其置於馬鈴薯葡萄糖瓊脂（PDA, potato dextrose agar, Difco, Maryland, USA）之培養皿（直徑 9 cm）內。葉片則切成 0.5×0.5 cm^2 小片。隨後將培養皿置於室溫下 2-3 天，待有菌絲自組織片段周圍長出時，觀察菌落形態，計算同一菌落形態分離株的分離率。之後，切取 PDA 培養基上分離株菌絲尖端，移植於新 PDA 培養基中，於室溫下培養。進行孢子形態觀察時，以移殖針切取 PDA 培養基中分離株的菌絲尖端，置於添加有消毒過後之馬拉巴栗根部組織塊（5×5×5 mm^3）的 2% WA（water agar）平板培養基上，經 20-40 天培養，以光學顯微鏡鏡檢、觀察分離菌株的柄子殼（pycnidia）、分生孢子梗（conidiophores）及分生孢子（conidia）形態，並量取柄子殼（20 個）與分生孢子（100 個）大小，再參考 Sutton[9] 與 Punithalingam[7]所描述的病原微生物孢子著生方式與形態，鑑定所分離之真菌。

溫度對病原菌菌絲生長的影響

將馬拉巴栗編辮苗根腐病菌之代表菌株 F211251、F212070、F212072 及 F212392 更新培養於 PDA 平板培養基上，於 24℃定溫箱培養 2 天。以 8-mm 打孔器切取菌落周圍菌絲，將菌絲塊置於新配製之 PDA 培養基平板上，距離培養皿邊緣 1 cm。隨即將 PDA 培養基平板分別放置於 4、8、12、16、20、24、28、32、36、37、38、39 及 40℃定溫箱中，每個處理溫度放置 5 個培養皿，每天觀察菌絲生長的情形，量取菌絲生長半徑，至菌絲長滿培養皿或生長 10 天為止，以測定其直線生長速率（mm/day）。

病原性測定

由上述分離株當中挑選菌株代號為 F211251 的分離株（分離自彰化溪洲），先在 PDA 上培養 3-5 天，再切取邊緣菌絲塊，移植於添加有消毒過後之馬拉巴栗組織塊的 2% WA 平板培養基上，置於 24℃ 定溫箱光照培養 4 星期。之後，將無菌水加入培養基內，利用移殖環輕刮培養基表面，所得之孢子懸浮液經兩層紗布過濾後，震盪混合均勻。於光學顯微鏡下，利用 micro pipette 計算單位體積的孢子數，並換算為孢子懸浮液的濃度，再利用無菌水調整孢子懸浮液濃度至 2×10^4 spores/mL，即為孢子懸浮液接種法（spore suspension inoculation）之接種源。取約 6 個月大的馬拉巴栗幼苗為供試植株，連根拔起後以自來水洗淨根部，將該些供試植株分為三個處理，包括 (1) 切除根尖部位（切面直徑約 1-2 cm），隨即接種供試菌株的孢子懸浮液；(2) 切除根尖部位，隨即置於通風陰涼處 7 天後，再行接種供試菌株的孢子懸浮液；及 (3) 先置於通風陰涼處 7 天後再切除根尖部位，並接種供試菌株的孢子懸浮液等，每一處理 15 株。接種時，每處理根部傷口以噴霧接種供試菌株孢子懸浮液 30 mL，對照處理接種無菌水。接種後，供試植株先行自然晾乾 10 min，再行假植於裝有泥炭土（peat moss, Tref, Jiffy, Netherlands）的 7 吋栽培盆中，每盆 5 株。每天觀察供試植株發病的情形，並於接種後 2 星期挖取所有供試植株，觀察植株根部的發病情形，並調查罹病度（disease severity）。罹病度之計算，係將接種株依發病程度分為 0-5 級：0 級表示未發現病徵；1 級表示病徵拓展長度小於 1 cm；2 級表示病徵拓展長度介於 1- 2 cm；3 級表示病徵拓展長度大於 2 cm；4 級表示植株死亡。所得之罹病等級（0- 4 級）資料，再換算為罹病度（disease severity, %）。罹病度（%）=$\Sigma R_n T_n/4N\times100\%$（$R_n$：代表罹病等級數；$T_n$：代表該罹病等級株數；N：接種株數）。

溫度對供試植株發病的影響

取約 6 個月大的馬拉巴栗苗為供試植株，連根拔起後以自來水洗淨根部，切除根尖部位（切面直徑約 1-2 cm）以製造人工傷口，備用。取供試菌株 F211251 更新培養於 PDA 培養基平板上，於 24℃定溫箱光照培養 2 天。由於分生孢子懸浮液之致病率不高，初步試驗結果發病率僅有 20%，改以菌絲塊為接種源，發病率可達 100%，因而以下病害試驗均以菌絲塊為接種源。以 8-mm 打孔器切取新鮮菌落周圍的菌絲塊，將該菌絲塊貼附於前述馬拉巴栗幼苗之根部傷口處，隨後以保鮮盒保濕後密封，置於 8、16、20、24、28、32 及 36℃無光照定溫箱中，每溫度處理 8 重複。每天觀察供試植株發病的情形，並於接種後第 7 與 28 天調查供試植株的罹病度

(disease severity, %)，調查方法如上述。

供試菌株的分子鑑定

DNA 抽取：選取 F211251 菌株供試，先於 PDA 培養 3-5 天，切取 3 × 3 × 2 mm^3 菌絲塊，移植於覆蓋一層玻璃紙（cellophane member）的 PDA 培養皿內，在 24℃下無光照培養 5-7 天後，將玻璃紙撕起，刮下菌絲，以無菌水沖洗，再經冷凍乾燥，保存於-20℃ 下備用。將冷凍乾燥的菌絲約 20 mg 置於研缽中，加入液態氮 (liquid nitrogen)後磨成粉末。抽取 DNA 時，依照廠商的操作步驟，利用 Genomic DNA Purification Kit（GeneMark Technology Co., Taichung, Taiwan）進行抽取。

聚合酶連鎖反應（PCR）與 DNA 定序（sequencing）：委託昕穎生物科技公司進行 PCR 反應與 DNA 定序。以供試菌株之 genomic DNA 為模板（templates），利用通用引子對（universal primers）ITS5（正向）與 ITS4（反向）[12]進行 PCR 反應，將核醣體內轉錄區間〔ribosomal internal transcribed spacer（ITS）regions〕的 DNA 序列增幅放大，包括 ITS1 與 ITS2 非轉錄（non-coding）區間、5.8S rDNA 基因，及部份 18S rDNA 基因與 28S rDNA 基因序列。將 PCR 反應後的 DNA 產物以 ITS5 與 ITS4 引子進行定序（direct sequencing）。

DNA 序列的組合（assembly）與 GenBank 資料庫搜尋：利用 Vector NTI 軟體（Vector NTI software v. 10.0，InforMax Inc., USA）工具，將獲得的 ITS1-5.8S rDNA-ITS2 區間 DNA 序列，分別經由組合（contingent）與修剪（trimming）後獲得完整序列，定序後的 DNA 序列則直接上載到 NCBI（http://www.ncbi.nlm.nih.gov）網站，利用 BLAST 軟體從 GenBank Database 中尋找最相近的 species 與菌株之 ITS 序列。

結 果

田間病徵觀察與病害調查

2011 年至 2013 年期間不定期前往彰化縣與雲林縣的馬拉巴栗主要栽培區、編辮場及集貨場進行病害調查。由田間、集貨場或編辮場採回之馬拉巴栗罹病株，自其罹病組織分離病菌。結果顯示從田間馬拉巴栗罹病株根系部位可分離得到疑似 *Lasiodiplodia* sp.、腐霉菌 (*Pythium* sp.)及少部分疫病菌（*Phytophthora* spp.），但分離自罹病葉片與莖部則無或甚少 *Lasiodiplodia* sp.，多為其他真菌或卵菌，包括疫病菌與腐霉菌[3]。分離得到 *Lasiodiplodia* sp.的結果如表一。三種病菌引起的病徵有相當差異；疫病菌主要為害幼苗期全株，一般病徵為褐色水浸狀斑點，嚴重時造成大量落葉死亡[3,4]；腐霉菌與疫病菌引起的病徵略相似，在編辮後經常發生，罹病組織呈暗褐色腐敗[3]；而被 *Lasiodiplodia* sp.侵染的組織則會變黑呈纖維狀炭化[2]。本文僅對 *Lasiodiplodia* sp.引起的黑腐病害做以下報告。並將其在馬拉巴栗造成苗木失編與根腐病徵者，稱之為馬拉巴栗編辮苗黑腐病，英名為 black rot of braided seedlings of Malabar chestnut。

病害調查結果顯示不論是小編苗（圖 1 A）、中編苗（圖 1 B）或是大編苗皆有發生根部組織軟化，切開後組織呈水浸狀，數天內變成黑褐色與纖維化（圖 1 C），莖部黃化、枯死，最後導致苗木失編或死亡。小編苗在 7-14 天內即會發病，發病率嚴重時可達 100%。而種植於田間的中、大編苗，則於回植後 0-3 個月內發病，罹病株初期表現無法抽新梢，縱使長出少許新葉也陸續黃化，莖部黃化、枯死，並長出黑色小斑點，為病菌之柄子殼（圖 1 D）。罹病株的地下部主根腐敗，罹病根呈黑褐色，最後導致苗木失編，發病率可高達 80%以上（圖 1 E）。此外，在田間外觀健康的編苗，經採收後集中於集貨場時，由於在田間或集貨場被病菌感染，貨品會由

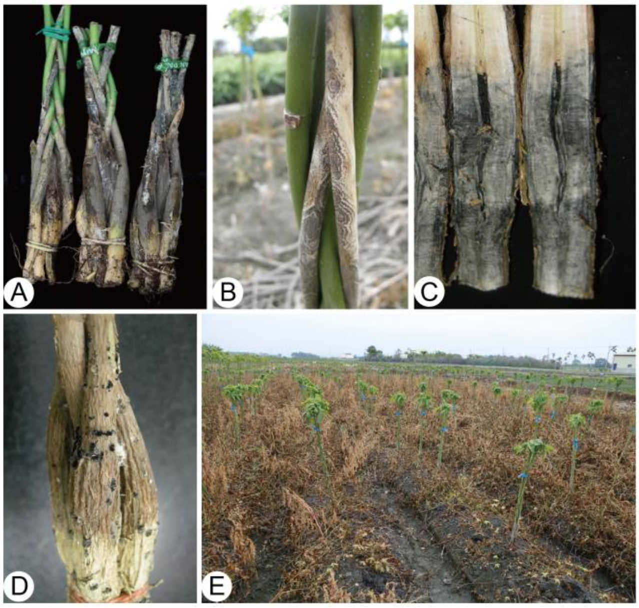

圖 1. 馬拉巴栗編辮苗黑腐病於小編苗 (A) 及中編苗 (B) 上發生，造成失編的病徵。(C) 縱切罹病株根部，組織表現軟化、黑褐色與纖維化。(D) 罹病株死亡後，罹病莖部長出黑色小斑點的柄子殼（pycnidia）。(E) 編苗移植於本田，黑腐病會於 1-3 個月內發病，嚴重時發病率高達 80%以上。

Fig. 1. The symptoms of black rot of small (A) and medial braided seedlings (B) of Malabar chestnut infected by *Lasiodiplodia thoebromae*. (C) Longitudinal section of diseased roots showing softened tissues with dark brown discoloration. (D) Black pycnidia formed on diseased stem after plant died caused by *L. theobromae*. (E) Serious black rot of braided seedling of Malabar chestnut in the field at 3 months after transplanting.

根部傷口開始發病，造成根系腐敗，導致無法出貨或被退運的情形。這種根腐情形在下雨過後，特別是 9 月上旬白露前後發生十分頻繁，嚴重時發病率可高達 80%以上。

病原菌分離與鑑定

由田間採回上述病徵之罹病株，在實驗室以 PDA 培養基進行病原菌分離，可觀察到有菌絲快速生長，3-5 天可以長滿整個培養皿（直徑 9 cm）。該菌菌絲有分支、具隔膜，初為白色，2-3 天後轉為灰色，繼而呈現濃密的灰褐色或黑褐（圖 2 A）。若切取菌絲尖端培養於添加消毒之馬拉巴栗組織塊的 2% WA 平板培養基上，經 20-40 天培養，則會有黑色柄子殼形成，其大小介於 0.7-3.4 mm 之間，平均 1.9 mm（圖 2 B）。成熟的柄子殼上會有孔口（ostioles），大量成熟的褐色分生孢子便由孔口擠壓釋放而出。未成熟的分生孢子透明、無隔膜、近卵形到長橢圓形、基部鈍狀。成熟的分生孢子為橄欖形或短桿狀、雙室、黑褐色、有縱向條紋，大小介於 11.4-17.5 × 21.5-31.1 μm 之間，平均 14.5 × 25.8 μm（圖 2 C）。而壓破柄子殼後，其內有亦有側絲（paraphyses）產生（圖 2 D）。根據以上的培養特性與孢子形態，再參考、比對 Sutton[9] 與 Punithalingam[7]所描述的病原微生物孢子著生方式與形態，初步鑑定該些分離株為 *Lasiodiplodia theobromae*（Pat.）Griff. & Maubl.。

溫度對病原菌菌絲生長的影響

將供試菌株 F211251、F212070、F212072 及 F212392 培養於 PDA 培養基平板，置於 4 到 40℃定溫箱中，觀察菌絲生長情形。結果顯示供試菌株之菌絲最適生長溫度為 28℃，菌絲生長速率介於 19.5-29 mm/day（圖 3）。而於 12℃以下與 39℃以上均無法生長。

病原性測定

將供試菌株 F211251 的孢子懸浮液分 3 個處理分別接種於供試植株的根部傷口處，結果此 3 個處理包括 (1) 切除根尖部位，隨即接種供試菌株的孢子懸浮液；(2) 切除根尖部位後，隨即置於通風陰涼處 7 天，再行接種供試菌株的孢子懸浮液；及 (3) 先置於通風陰涼處 7 天後再切除根尖部位，並接種供試菌株的孢子懸浮液，於接種後 2 星期內皆無觀察到供試植株發生地上部葉片黃化與失綸的病徵。接種 2 星期後調查該些處理的根部罹病度分別為 20%、8%及 22%，對照組則皆不發病。接種發病的植株，其根部表現出與田間罹病株相同的病徵，包括組織軟化，切開後組織呈水浸狀，靜置 2-3 天後變成黑褐色與纖維化。由該些接種發病的罹病部位，利用 PDA 培養基則可重新分離得到與供試菌株 F211251 相同的分離株，完成柯霍氏法則（Koch's postulates）。

溫度對供試植株發病的影響

由於接種分生孢子懸浮液造成之植株發病率不高，改以菌絲塊接種，發病率可達 100%，因而以下病害試驗均以菌絲塊為接種源。取供試菌株 F211251 菌絲塊，接種於供試馬拉巴栗根部傷口處，隨後以保鮮盒保濕後密封，置於 8 到 36℃（每 4℃間隔）定溫箱中。接種後第

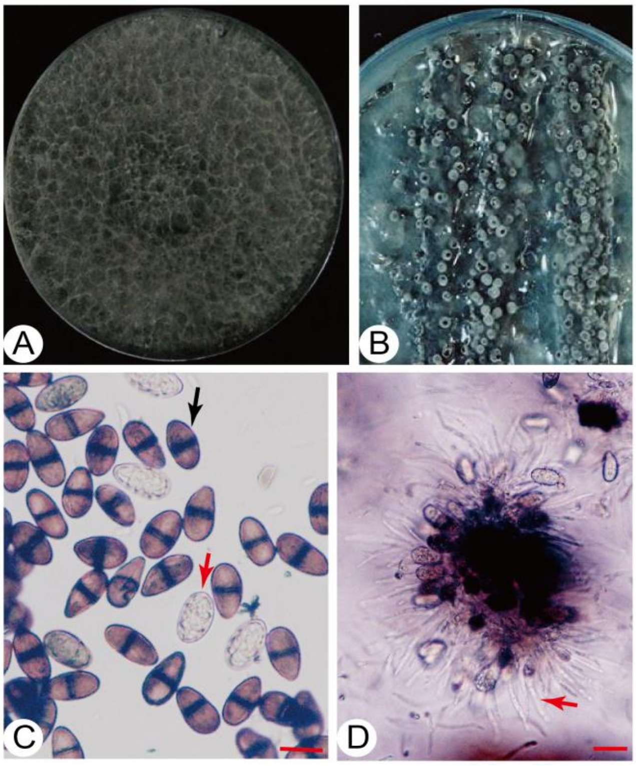

圖 2. **馬拉巴栗黑腐病菌 *Lasiodiplodia theobromae* 的形態特性。(A) *L .theobromae* 於 PDA 培養基上，菌落形態呈現濃密的灰黑或暗黑色。(B) *L. theobromae* 培養於添加馬拉巴栗組織塊的 2% WA 培養基上，形成黑色柄子殼（pycnidia）。(C) *L. theobromae* 未成熟的分生孢子為單室、透明（紅色箭頭），成熟的分生孢子為雙室、黑褐色、有縱向條紋（黑色箭頭）（bar= 20 μm）。(D) 柄子殼內有側絲（paraphyses）產生（紅色箭頭）（bar = 20 μm）。**

Fig. 2. ***Morphological* characteristics of *Lasiodiplodia theobromae* isolated from Malabar chestnut. (A) Colony of *L. theobromae* on PDA medium was grey to dark black, fluffy, with abundant aerial mycelium. (B) Pycnidia formed on 2% WA medium amended with Malabar chestnut tissues. (C) Young conidia, unicellular, hyaline, sub-ovoid to oblong (red arrow); mature conidia, 1-septated, brown to dark brown, thick-walled, base truncate with longitudinally striate (black arrow) (bar= 20 μm). (D) Paraphyses in pycnidia (red arrow) (bar= 20 μm).**

7 天調查供試植株的罹病度（disease severity），結果顯示當溫度介於 24-32℃時，供試植株的罹病度皆為 100%，而於 12℃以下未發病。接種後第 28 天調查供試植株的罹病度，顯示溫度介於 20-32℃時，供試植株罹病度皆為 100%，而於 8℃未發病（圖 4）。

供試菌株的分子鑑定

利用分子生物技術鑑定供試菌株 F211251，結果顯示 F211251 菌株之 ITS 序列與 NCBI 資料庫之 *L. theobromae* CMW28626 菌株之 ITS 序列（GenBank accession number GQ469934.1）相似度（identity）達 100 %，佐證 F211251 為 *L. theobromae* 之形態鑑定結果。

討 論

在台灣，馬拉巴栗主要除了受到 *L. theobromae* 感染引起編苗黑腐病之外，其他主要病害尚包括有苗木疫病〔由病原菌 *Phytophthora palmivora*（E. J. Butler）E. J. Butler 和 *P. nicotianae* B. de Haan 引起〕[3,4]與腐霉根腐病（由 *Pythium splendens* H. Braun 引起）[3]，此外馬拉巴栗亦是褐根病菌 *Phellinus noxius*（Corner）G. H. Cunn 的寄主[1]。

Lasiodiplodia theobromae〔teleomorph *Botryosphaeria rhodina*（Cooke）V. Arx.〕〔syn. *Botryodiplodia theobromae* Pat., *Diplodia natalensis* P. Evens 及 *Diplodia tubericola*（Ellis & Everh.）Taubenh 等〕的寄主範圍很廣，超過 500 種以上，常見病害可依感染作物部位的不同而區分為蒂腐病（stem end rot）、果腐病（fruit rot）、莢腐病（pod rot）、葉枯病（leaf blight）、莖腐病（stem rot）、冠腐病（crown rot）、頸腐病（collar rot）、根腐病（root rot）、萎凋病（wilt）、流膠病（gumosis）等[7]。在台灣，*L. theobromae* 引起的病害記錄並不多，主要引起果樹及其他作物的果腐病、蒂腐病、炭化病、黑腐病、黑化病、莖枯病、枝枯病及根腐病等[5]。而 *L. theobromae* 主要在馬拉巴栗造成編苗根部組織軟化，數天內變成黑褐色與纖維化，罹病根皆呈現黑腐的病徵，最後導致苗木失編（圖 1），因此本研究將此病害稱之為馬拉巴栗編辮苗黑腐病（black rot of braided seedlings of Malabar chestnut）。

Lasiodiplodia theobromae 為一種伺機性傷痍病原菌（opportunistic wound pathogen），靠風與水傳播，亦可存活於土壤中[7]。該菌會為害作物造成嚴重病害，與植株本身受傷及當時的氣候條件有關，通常傷口有助於病原菌孢子的侵入，而溫暖潮濕的氣候有助於病勢進展[6]，下雨則會幫助本病菌孢子的釋放與傳播[10]。本研究發現馬拉巴栗黑腐病菌菌絲的最適生長溫度為 28℃（圖 3），最適發病溫度為 24-32℃（圖 4）。由田間病害調查發現，馬拉巴栗編辮苗黑腐病的發生與馬拉巴栗苗木的拔苗與切根作業都會造成嚴重傷口有關，特別是在下雨過後，編辮苗發病率可高達 80%以上。

由田間馬拉巴栗罹病株表現病徵的根、莖及葉等部位分離 *L. theobromae*，結果該病原菌絕大部分由罹病根部分離得到，由此可知馬拉巴栗編辮苗黑腐病的主要感染位置在容易產生傷口的根部。本研究認為 *L. theobromae* 一般存在土壤表面與空氣中，且寄主範圍廣泛，但它為伺機性病原菌，多危害衰弱與受傷的植物。當馬拉巴栗苗木送至編辮場時已有多處傷口，編辮後又經過切根與修剪處理，受傷十分嚴重，因此給予病菌入侵機會。若能於出現傷口前、後施用適當的藥劑保護傷口，則可於田間防治本病害。因此，保持田間衛生，降

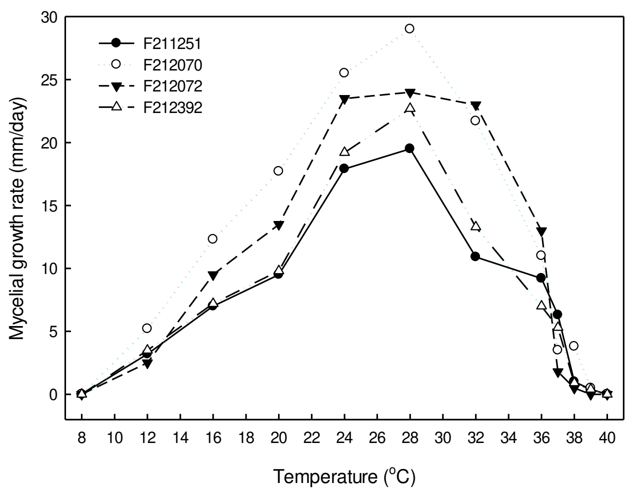

圖 3. 溫度對馬拉巴栗黑腐病菌菌株菌絲在馬鈴薯葡萄糖培養基(PDA)生長的影響。

Fig. 3. Effect of temperatures on the mycelial growth of *Lasiodiplodia theobromae* isolates from Malabar chestnut on potato dextrose agar (PDA).

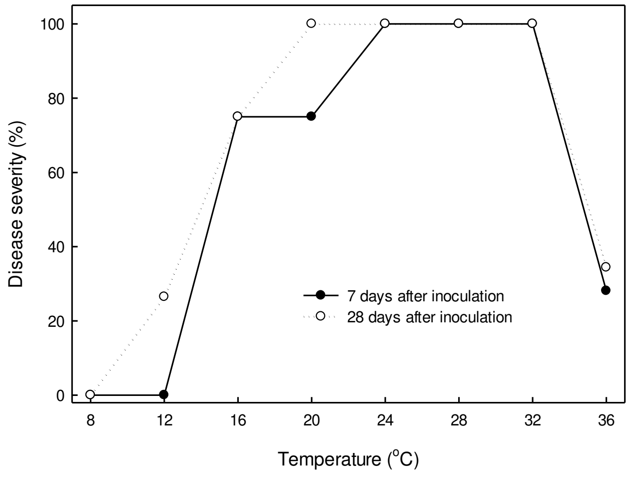

圖 4. 溫度對馬拉巴栗黑腐病病勢發展的影響。

Fig. 4. Effect of temperatures on the disease development of black rot of braided seedlings of Malabar chestnut inoculated with *Lasiodiplodia theobromae*.

低田間病原密度，並在編辮、移植或是採收前針對編苗植株進行施藥，應可減少馬拉巴栗編辮苗黑腐病的發生。本研究自 2011 年開始，即在實驗室進行可供馬拉巴栗編辮苗黑腐病防治的藥劑篩選，並進行多次田間防治試驗，所得防治效果良好（資料另文），抑病效果良好的藥劑包括 41.8%腐絕水懸劑與 62.5%賽普護汰寧混合水分散性粒劑等，待行政手續完成後，可將結果推薦給農民使用。

誌　謝

本文承蒙行政院農業委員會科技計畫 101 農科-14.2.1-檢-B3(3)與 102 農科-14.2.1-檢-B3(3)補助試驗經費，及柯文雄教授修改英文，謹此誌謝。

引用文獻

1. Ann, P. J., Lee, H. L., Tsai, J. N. 1999. Survey of brown root disease of fruit and ornamental trees caused by *Phellinus noxius* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 8: 51-60.
2. Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C. W., Hsu, Z. H., Young, C. K., Tsay, H. C., and Chern, L. L. 2012. Seedling braiding disease of Malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* and management of root rot disease of this crop in the fields. Plant Pathol. Bull. 21:150-151. (Abstract in Chinese)
3. Ann, P. J., Su, J. F., Yang, C. W., Lin, J. P., Tsay, H. C., and Chern, L. L. 2013. Seedling disease of Malabar chestnut caused by *Phytophthora* and *Pythium* and chemical control in greenhouse. Plant Pathol. Bull. 22:169-170. (Abstract in Chinese)
4. Chen, J. W., Chern, L. L., Her, S. P., and Chen, L. Y. 2010. Study on stem rot of *Pachina macrocarpa.* Plant Pathol. Bull. 19:291. (Abstract in Chinese)
5. Hsu, S. T., Chang, T. T., Chang, C. C., Tsai, J. L., and Tsay, T. T. 2002. List of Plant Diseases in Taiwan 4th ed. Taiwan Phytopathological Society, Taiwan. 386 pp. (in Chinese)
6. Li, Z., Wang, Y. T., Gao, L., Wang, F., Ye, J. L., and Li, G. H. 2014. Biochemical changes and defense responses during the development of peach gummosis caused by *Lasiodiplodia theobromae*. Eur. J. Plant Pathol. 138: 195-207.
7. Punithalingam, E. 1976. *Botryodiplodia theobromae*. CMI Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria No. 519.
8. Shen, R. S. 2005. Malabar chestnut. p.877-822. *in* Taiwan Agriculture Encyclopedia: Crop edition-2. Council of Agriculture, Executive Yuan, Taipei.
9. Sutton, B. C. 1980. The Coelomycetes: fungi imperfecti with pycnidia, acervuli and stromata. Comm. Mycol. Inst., England. 696 pp.
10. Úrbez-Torres, J. R., Battany, M., Bettiga, L. J., Gispert, C., McGourty, G., Roncoroni, J., Smith, R. J., Verdegaal, P., and Gubler, W. D. 2010. Botryosphaeriaceae species spore-trapping studies in California vineyards. Plant Dis. 94: 717-724.
11. Wang, T. S. 2010. Handbook of Postharvest Treatment for Malabar chestnut. Taiwan Pot-Plants Association, Taipei, 32 pp.
12. White, T. J., Bruns. T., Lee, S., and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of ribosomal RNA genes for applications. p. 315-322 *in* PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. Innis, M.A., Gelfand, D. H., Snirsky, J. J., and White, T. J. (*eds*) Academic Press, San Diego.

ABSTRACT

Su, J. F.[1], Ann, P. J.[1,6], Yang, C. W.[1], Hsu, Z. H.[1], Chern, L. L.[2], Tsay, H. C.[3], Huang, C. C.[4] and Hsieh, T. F.[5]. 2014. Black rot of braided seedlings of malabar chestnut caused by *Lasiodiplodia theobromae* in Taiwan. Plant Pathol. Bull. 23: 263-269. ([1]Plant Pathology Division, Taiwan Agricultural Research Institute (TARI), Council of Agriculture (COA), Wefeng, Taichung, Taiwan, ROC.; [2] Department of Plant Medicine, National Pingtung University of Science and Technology, Pingtung, Taiwan, ROC.; [3] Animal and Plant Health Inspection and Quarantine Bureau, Taichung Branch, COA; Chiayi, Taiwan, ROC.; [4] Crop Science Division, TARI, COA, Wefeng, Taichung, Taiwan, ROC.; [5] Floriculture Research Center, TARI, COA, Yunlin, Taiwan, ROC.; [6] Corresponding author, e-mail: pjann5039@gmail.com, Fax: +886-4-23302803)

During field survey from 2011 to 2013, many diseased braided seedlings of Malabar chestnut were found to show root rot and stem yellowing and wilted, which finally caused the death of the whole plant. Longitudinal sections of the diseased root tissues showed internal dark brown discoloration. For the young braided seedlings (3- to 6-month-old), the disease symptoms appeared 7-14 days after braiding, and the disease incidence could reach as high as 100%. The disease incidence was up to 60% for larger braided seedlings (1- to 2-year-old) after transplanting into the field for 0-3 months. After harvesting, similar disease symptoms also appeared on the wounded part of the harvested plants. Such commodities would lose their values in export markets. Several fungi and oomycetes were isolated from the diseased samples, but only one fungus caused black rot on the inoculated seedlings. Therefore, the fungus isolate F211251 was chosen to conduct the pathogenicity test for completing Koch's postulates. According to the morphological characteristics and the molecular sequence of internal transcribed spacer (ITS) of ribosomal DNA, the pathogen was identified as *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. & Maubl. The disease was named as braided seedling black rot of Malabar chestnut. The colony of the pathogen on PDA medium was grey to black, fluffy, with abundant aerial mycelium. It formed numerous black pycnidia [0.7-(1.9)-3.4 mm] on 2% water agar amended with host tissues. Young conidia were unicellular, hyaline, sub-ovoid to oblong. Mature conidia become 1-septated, brown to dark brown, thick-walled, base truncate, often longitudinally striate, and its size was 11.4-(14.5)-17.5×21.5-(25.8)-31.1 µm. The optimum temperatures for mycelial growth and disease development were 28℃ and 24-32℃, respectively. The disease of braided seedling black rot of Malabar chestnut caused by *L. theobromae* has not been reported in any other countries prior to this report.

Key words: Malabar chestnut, *Lasiodiplodia theobromae*, wounded treatment, braided seedling black rot.